



**UNIVERSIDAD DE CUENCA FACULTAD
DE CIENCIAS MÉDICAS ESCUELA DE
TECNOLOGÍA MÉDICA CARRERA DE
LABORATORIO CLÍNICO**

**FRECUENCIA DEL CROMOSOMA FILADELFIA EN PACIENTES DE
SOLCA (SOCIEDAD DE LUCHA CONTRA EL CÁNCER) - CUENCA CON
DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA EN EL PERIODO 2014-2018, CUENCA 2021.**

Proyecto de investigación previo a la
Obtención del Título de Licenciado
en Laboratorio Clínico.

Autoras:

Paula Dennise Molina Beltrán

CI: 0302237714

dennisemb23@gmail.com

María del Carmen Nugra Sánchez

CI: 0106471451

marynugrs@gmail.com

Director:

Dr. Gabriele Davide Bigoni Ordoñez

CI: 1711901429

**Cuenca-Ecuador
19-Agosto-2021**



RESUMEN

Antecedentes: La leucemia es una neoplasia con características clínicas, citogenéticas y moleculares distintas. La transformación maligna de una célula hematopoyética mieloide o linfóide y la posterior proliferación clonal de células que desplazan la hematopoyesis normal, ocupan más del 20% de la celularidad en médula ósea, sangre periférica y otros tejidos. La translocación de los cromosomas 9 y 22 (cromosoma Filadelfia o Ph), fue el primer gen en ser descrito como causante de las neoplasias hematológicas.

Objetivo: Determinar la frecuencia del cromosoma filadelfia en pacientes de SOLCA con diagnóstico de leucemia en el periodo 2014-2018.

Metodología: Estudio de tipo descriptivo transversal, en el cual se realizó el análisis de los datos demográficos y factores asociados de pacientes que se realizaron la prueba de detección del gen BCR- ABL y con diagnóstico de leucemia en el periodo 2014- 2018 en SOLCA- Cuenca. Los datos fueron recopilados a través del sistema de información de SOLCA aplicando un formulario, una vez obtenida la información, se efectuó la interpretación mediante tablas y gráficos.

Resultado: Los resultados obtenidos demostraron que la frecuencia del cromosoma Filadelfia en el periodo 2014-2018 fue del 94,5%, el grupo etario con mayor número de casos positivos estuvo comprendido entre las edades de 41 a 50 años de edad con un porcentaje del 21,4%, con un predominio en el sexo masculino en un 57,7% y presentándose principalmente en la leucemia mieloide crónica en un 92,1%, por otro lado no se encontró relación estadísticamente significativa respecto al lugar de procedencia.

Palabras claves: Cromosoma Filadelfia, BCR-ABL, Leucemia, qPCR



ABSTRACT

Background: Leukemia is a neoplasm with distinct clinical, cytogenetic and molecular features. Malignant transformation of a myeloid or lymphoid hematopoietic cell and subsequent clonal proliferation of cells that displace normal hematopoiesis occupy more than 20% of the cellularity in bone marrow, peripheral blood and other tissues. The translocation of chromosomes 9 and 22 (Philadelphia or Ph chromosome) was the first gene to be described as the cause of hemato-oncologic neoplasms.

Objective: To determine the frequency of the Philadelphia chromosome in SOLCA patients diagnosed with leukemia in the period 2014-2018.

Methodology: Cross-sectional descriptive study, in which the analysis of demographic data and associated factors of patients who underwent BCR- ABL gene screening and with a diagnosis of leukemia in the period 2014- 2018 in SOLCA- Cuenca was performed. The data were collected through SOLCA's information system by applying a form, once the information was obtained, the interpretation was performed using tables and graphs.

Result: The results obtained showed that the frequency of Philadelphia chromosome in the period 2014-2018 was 94.5%, the age group with the highest number of positive cases was between the ages of 41 to 50 years old with a percentage of 21.4%, with a predominance in the male sex in 57.7% and presenting mainly in chronic myeloid leukemia in 92.1%, on the other hand no statistically significant relationship was found with respect to the place of origin.

Key words: Philadelphia Chromosome, BCR-ABL, Leukemia, qPCR



ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.....	6
CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.....	7
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL.....	8
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL.....	9
AGRADECIMIENTO.....	10
AGRADECIMIENTO.....	11
DEDICATORIA	12
DEDICATORIA	13
CAPÍTULO I.....	14
1.1. INTRODUCCIÓN	14
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
1.3. JUSTIFICACIÓN	18
CAPÍTULO II	19
2.1. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	19
2.1.1. CARCINOGENESIS.....	19
2.1.2. LEUCEMIA	20
2.1.3. CLASIFICACIÓN.....	20
2.1.4. ETIOPATOGENIA	23
2.1.5. DIAGNÓSTICO	24
2.1.6. LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA	24
2.1.7. LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA	25
2.1.8. CROMOSOMA FILADELFIA	26
2.1.9. ETIOLOGÍA.....	27
2.1.10. EVOLUCIÓN Y PRONÓSTICO.....	27
2.1.11. DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	28
CAPÍTULO III	34
OBJETIVOS.....	34
3.1. OBJETIVO GENERAL	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34



CAPÍTULO IV.....	35
4. METODOLOGÍA.....	35
4.1. TIPO DE ESTUDIO.....	35
4.2. ÁREA DE ESTUDIO	35
4.3. UBICACIÓN GEOGRÁFICA	35
4.4. UNIVERSO Y MUESTRA	35
4.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	35
4.6. VARIABLES DEL ESTUDIO	36
4.7. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	36
4.8. MÉTODO, TÉCNICAS E INSTRUMENTOS.....	36
4.9. PROCEDIMIENTO	37
4.10. PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS.....	37
4.11. CONSIDERACIONES BIOÉTICAS.....	37
CAPÍTULO V	39
5. RESULTADOS	39
CAPÍTULO VI.....	44
6. DISCUSIÓN	44
CAPÍTULO VII.....	46
7.1. CONCLUSIONES.....	46
7.2. RECOMENDACIONES.....	47
CAPÍTULO VIII.....	48
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
CAPÍTULO IX.....	52
9. ANEXOS.....	52
9.1. ANEXO 1: OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	52
9.2. ANEXO 2: FORMULARIO DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	53
9.3. ANEXO 3 : OFICIO AL DIRECTOR DEL INSTITUTO DEL	
CANCER SOLCA- CUENCA.....	54



CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Paula Dennise Molina Beltrán en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **“FRECUENCIA DEL CROMOSOMA FILADELFIA EN PACIENTES DE SOLCA (SOCIEDAD DE LUCHA CONTRA EL CÁNCER) – CUENCA CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA EN EL PERIODO 2014-2018, CUENCA 2021”**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 20 de julio de 2021.

Paula Dennise Molina Beltrán

C.I: 030227714



CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, María del Carmen Nugra Sánchez en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **“FRECUENCIA DEL CROMOSOMA FILADELFIA EN PACIENTES DE SOLCA (SOCIEDAD DE LUCHA CONTRA EL CÁNCER) – CUENCA CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA EN EL PERIODO 2014-2018, CUENCA 2021”**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 20 de julio de 2021.

María del Carmen Nugra Sánchez

C.I: 0106471451



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo, Paula Dennise Molina Beltrán autora del trabajo de titulación **“FRECUENCIA DEL CROMOSOMA FILADELFIA EN PACIENTES DE SOLCA (SOCIEDAD DE LUCHA CONTRA EL CÁNCER) – CUENCA CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA EN EL PERIODO 2014-2018, CUENCA 2021”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 20 de julio de 2021.

Paula Dennise Molina Beltrán

C.I: 030227714



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo, María del Carmen Nugra Sánchez autora del trabajo de titulación **“FRECUENCIA DEL CROMOSOMA FILADELFIA EN PACIENTES DE SOLCA (SOCIEDAD DE LUCHA CONTRA EL CÁNCER) – CUENCA CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA EN EL PERIODO 2014-2018, CUENCA 2021”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 20 de julio de 2021.

María del Carmen Nugra Sánchez

C.I: 0106471451



AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por brindarme el conocimiento y la sabiduría necesaria para perseverar por mis sueños, mi vocación de ser altruista y velar por la salud de los demás.

A mis padres, por brindarme el apoyo incondicional e impulsarme a ser mejor cada día, las palabras nunca serán suficientes para expresar mi afecto y mi gratitud a quienes son la razón de todo mi esfuerzo y sacrificio.

A mi estimado tutor, Dr. Gabriele Bigoni por la paciencia y generosidad de impartir sus conocimientos, gracias por ser el ejemplo de perseverancia, responsabilidad y autenticidad.

De manera especial, a mi hogar de estudio, Universidad de Cuenca por abrir sus puertas y permitirme formar como profesional.

Gracias a mi mejor amiga María del Carmen Nugra, por permanecer conmigo en esta ardua trayectoria universitaria.

Paula Dennise Molina Beltrán.



AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a la virgen María por protegerme, bendecirme y haberme dado las fuerzas necesarias para superar dificultades y obstáculos que se presentaron a lo largo de todos estos años.

A mi mamá, una madre ejemplar que a través de sus consejos me enseñó a no rendirme ante nada, por acompañarme en este arduo camino y compartir conmigo alegrías y tristezas, no habrá manera de devolverle todo lo que me ha ofrecido desde el día en que nací.

A toda mi familia gracias por su apoyo incondicional y por demostrarme la gran fe que tienen hacia mí.

Al Doctor Gabriele Bigoni, por su valiosa ayuda y paciencia, quien con sus conocimientos y experiencia ha permitido desarrollar este proyecto de tesis, en un marco de confianza y sobre todo de amistad.

A mi compañera de tesis Dennise, que a más de ser una compañera de clases, fue mi compañera de vida durante estos años de universidad, gracias por estar siempre en los momentos felices pero sobre todo en los más duros.

A la Universidad de Cuenca por abrirme sus puertas y permitirme formarme en ella, de igual manera a todos los docentes quienes se tomaron el arduo trabajo de compartirme sus conocimientos y guiarme a ser una excelente profesional.

Agradezco al instituto del cáncer SOLCA- Cuenca por habernos brindado los recursos necesarios para la realización de nuestro proyecto de investigación.

Finalmente, gracias a todas las personas que estuvieron conmigo en estos años y me ayudaron de forma directa o indirecta para culminar este sueño.

María del Carmen Nugra Sánchez



DEDICATORIA

Dedico este logro a Dios, por fomentar mi espíritu y brindarme la salud y fuerzas necesarias para seguir adelante con cada propósito de mi trayectoria profesional.

A mi santísima madre Gladys y mi padre Diego, por ser los pilares fundamentales de mi existencia, y ser la principal razón de mi felicidad, esto es por y para ustedes.

A mis abuelitos Darío y Leonor que siempre serán partícipes en los momentos más importantes de mi vida, de igual manera a mis hermanos Diego y Dayana por ser mi modelo a seguir.

A Patricio, por permanecer a mi lado incondicionalmente.

111.

Paula Dennise Molina Beltrán



DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a Dios, quien inspiro mi espíritu, por darme la sabiduría, fuerza, salud y bendición para poder crecer como persona y como profesional.

A mi mami Carmen, por ser el pilar más importante en mi vida, por demostrarme su cariño y apoyo incondicional, por haberme formado con buenos sentimientos y valores, sin ella no habría logrado cumplir este sueño, espero que este sea el primero de los tantos triunfos que pueda dedicarle.

A mi abuelito, mi papito Juan que, a pesar de no estar presente, sé que desde el cielo me guía y me cuida, y aunque nos faltaron muchos momentos por vivir sé que este hubiese sido tan especial para él como lo está siendo para mí.

A mi abuelita Isabel, a mis tías, tíos y primos que siempre han estado junto a mí, por confiar y creer en mí, dándome su apoyo incondicional y compartiendo conmigo buenos y malos momentos.

Finalmente, a mis amigos, que por medio de sus bromas y chistes me han demostrado su apoyo y motivación siempre.

María del Carmen Nugra Sánchez



CAPÍTULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

El término cáncer comprende un conjunto de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento y desarrollo de células anormales que se dividen de forma autónoma pudiendo diseminarse hacia diferentes estructuras del organismo (1).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolada de las células, las mismas que invaden el tejido circundante pudiendo dirigirse a puntos distantes del organismo, proceso conocido como metástasis (2).

Toda célula realiza el ciclo celular en el cuál se dividen, maduran y mueren durante un periodo de tiempo programado; sin embargo, la célula cancerosa o tumoral no cumple de manera normal este ciclo y se divide de manera continua (3).

Un tumor se considera benigno cuando las células no poseen la capacidad de invadir a otras áreas del organismo si no que se caracterizan por presentar un crecimiento lento y se limitan a desarrollarse en el lugar de origen, por el contrario, un tumor maligno está constituido por células cancerosas con un crecimiento rápido, pudiendo invadir tejidos cercanos (3).

La división celular está regulada por genes que controlan el crecimiento y diferenciación celular, estos han sido categorizados en dos grupos, los protooncogenes y genes supresores de tumores; los protooncogenes están involucrados en vías de proliferación, pero una mutación los convierte en oncogenes permitiendo a la célula realizar una proliferación descontrolada. Por el contrario, los genes supresores de tumores están relacionados en la regulación del ciclo celular con capacidad de detener la proliferación, pero en ciertos casos suceden mutaciones en los mismos, los cuales inactivan su función permitiendo un crecimiento celular desregulado (4). Al momento de producirse un daño celular que no puede ser reparado, el mecanismo de defensa de las células, es realizar una autodestrucción celular (apoptosis) que impide que el daño sea heredado por la siguiente generación de células. Cuando los mecanismos de control se alteran en una célula con el tiempo se puede producir la formación de un tumor (1).

Molecularmente, el cáncer es una enfermedad ocasionada por la alteración en el material genético (DNA) siendo más comunes las variaciones en el número de copias, incluida la amplificación o eliminación de las regiones genómicas. De igual forma el cáncer se desarrolla por la modificación en los mecanismos de regulación (daño epigenético) que consiste en la adición o eliminación de marcas químicas siendo la metilación del DNA clave en el control de la actividad de los genes, tanto una hipometilación como una hipermetilación puede originar inestabilidad cromosómica y pérdida de la huella genética (5,6).

Las alteraciones genéticas son inducidas por el envejecimiento, químicos mutagénicos, radiación, luz ultravioleta (UV), radicales de oxígeno y otros factores (acetaldehído generado a partir de etanol, radicales de oxígeno, entre otros) sin embargo, se desconoce cuál es el mecanismo de que dichos factores desencadenan un proceso canceroso. Casi el 20% de los cánceres están asociados con infecciones crónicas, los más importantes son los virus de la hepatitis (VHB, VHC), virus del papiloma (VPH) y *Helicobacter pylori*, cada vez se reconoce más el papel causal de factores de estilo de vida, incluida la dieta, la falta de actividad física y el consumo excesivo de alcohol. La susceptibilidad genética puede alterar significativamente el riesgo de exposiciones ambientales (6).

La técnica diagnóstica más empleada para la cuantificación de la expresión del gen de fusión es la reacción en cadena a la polimerasa por retrotranscripción (RT-PCR) que amplifica el material nucleico y determina de forma sensible y específica los transcritos BCR-ABL. Del mismo modo permite la monitorización y seguimiento de pacientes con diagnóstico de leucemia, todo ello complementado con estudios citológicos y citogenéticos de células que albergan el cromosoma Filadelfia, presentes en sangre y médula ósea (7).

La alteración cromosómica peculiar en la LLA como en la LMC es la expresión del gen de fusión BCR-ABL, producida por la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22, t (9;22) (q34; q11) que codifica una proteína anormal con actividad tirosina quinasa constitutivamente activa, capaz de acelerar el proceso de división celular e inhibir la reparación del DNA lo que resulta en inestabilidad genómica y susceptibilidad al desarrollo de anomalías genéticas; es por ello que la presencia de la oncoproteína se considera como un marcador diagnóstico para la enfermedad (8).



1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Instituto Nacional del Cáncer (NIH) define a la leucemia como un tipo de cáncer que afecta a los tejidos en donde se originan las células sanguíneas (médula ósea) produciéndose una maduración anormal. La leucemia se clasifica de acuerdo al tipo de células que se ven afectadas que puede ser mieloide o linfóide y debido a su proliferación rápida o lenta como crónica o aguda. Es por esto que la leucemia se clasifica como leucemia linfocítica aguda o crónica y leucemia mieloide aguda o crónica (9).

Estadísticas de Globocan, indican que la prevalencia de la leucemia a nivel mundial en los últimos 5 años en una población de 43'841.302 que padecen cáncer fue de 1'174.433 con un porcentaje estimado de 2.7%. Por el contrario, a nivel de Latinoamérica y el Caribe con una población de 3'336.448 fue de 101.256 con un porcentaje estimado del 3%. En Ecuador, observamos que, en una población de 63.729, la prevalencia fue de 3.301 con un porcentaje estimado de 5.2% (10).

En el 2018, la mortalidad por causa de la leucemia a nivel mundial, fue de 309.006 (3.2%) en ambos sexos en un rango de edades de 0-85 años en una población total de 9'555.027. En Latinoamérica y el Caribe, la mortalidad fue de 26.222 (3.9%) en ambos sexos en una población total de 672.758. En Ecuador, el número estimado de muertes por leucemia fue de 887 personas con un porcentaje estimado de 6.1% en una población total de 14.559 (10).

Si hablamos de la incidencia, a nivel mundial fue de 437.0333 (2.4%) en ambos sexos en un rango de edades de 0-85 años en una población total de 18'078.957. En Latinoamérica y el Caribe fue de 36.804 (2.6%) en ambos sexos en una población total de 1'412.132. En Ecuador, fue de 1.188 personas con un porcentaje estimado de 4.2% en una población total de 28.058. Por lo que, Ecuador se encuentra con una de las tasas más elevadas de incidencia al correlacionar con varios países de Latinoamérica, convirtiéndose en un problema de Salud en Ecuador (10).

El gen de fusión BCR-ABL expresado por el cromosoma Filadelfia se caracteriza por activar constitutivamente una tirosina quinasa (TK) que causa la proliferación desregulada de células sanguíneas anormales interrumpiendo el desarrollo normal de la hematopoyesis normal; la transformación fenotípica de la enfermedad se presenta con neutrofilia, monocitosis y trombocitopenia (10).



El cromosoma Filadelfia se detecta en más del 95% de los casos con diagnóstico de LMC, mientras que en los casos restantes la translocación puede ser críptica, lo que implica demostrar el reordenamiento BCR-ABL por medio de la PCR en tiempo real. Por el contrario, alrededor del 25–35% de los pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda (LLA) presenta dicha aberración citogenética, considerada como un subtipo altamente frecuente de LLA en adultos y se asocia con un mal resultado (8,11).

Por lo tanto, es importante dar respuesta a nuestra pregunta de investigación ¿Cuál es la frecuencia del gen de fusión BCR-ABL en pacientes de SOLCA de la ciudad de Cuenca con diagnóstico de leucemia durante el periodo 2014-2018?.



1.3. JUSTIFICACIÓN

Los pacientes con leucemia representan una población cada vez más numerosa, sin distinción de raza ni sexo. Tanto la incidencia como la mortalidad a causa de este padecimiento alcanzan un mayor porcentaje cada año en el Ecuador. La translocación de los cromosomas 9 y 22 (el cromosoma Filadelfia o Ph), fue el primer gen descrito como causante de neoplasias hematológicas caracterizado por la activación de una cascada proteica que controla el ciclo celular, acelerando la división celular e inhibiendo la reparación del ADN, por lo tanto, esta inestabilidad genómica permite que las células sean más propensas a desarrollar anomalías genéticas. La proteína BCR-ABL es la causa fisiopatológica de la leucemia mieloide crónica en un 95% y de la leucemia linfocítica aguda en un 25%, la cual activa de forma constitutiva una tirosina cinasa (TK) que provoca la proliferación no regulada de células sanguíneas anormales e interrumpe la hematopoyesis normal.

La genética molecular ha tenido una importancia cada vez mayor en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la leucemia. Prácticamente todos los tipos de leucemia tienen factores pronósticos que están determinados por la citogenética y biología molecular; más específicamente, por mutaciones adquiridas que, una vez detectadas, hacen posible definir el tratamiento adecuado para un paciente determinado.

Dicho estudio está enmarcado de forma explícita en las líneas de investigación definidas en el Modelo de Priorización en Salud 2013-2017, elaborado por el Ministerio de Salud Pública (MSP) del Ecuador, establecido en el área de neoplasias, en la línea de investigación hematológica, la cual incluye su perfil epidemiológico y predisposición genética.

CAPÍTULO II

2.1. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1.1. Carcinogénesis

La carcinogénesis es el proceso del desarrollo del cáncer, caracterizado por la proliferación autónoma de células neoplásicas que poseen varias alteraciones genéticas, epigenéticas e inestabilidad genómica que permite a estas células su replicación, supervivencia, así como la de evadir los mecanismos reguladores del ciclo celular, la proliferación y la apoptosis (12,13).

El cáncer comprende varias etapas que requieren de una mutación somática y de selección clonal que con el paso del tiempo originarán variantes en la descendencia de la célula, con características de crecimiento y diseminación poco a poco más agresivas. Desde un punto de vista molecular y genético, es un proceso que se desencadena de forma secuencial e implica la acumulación de sucesivas mutaciones en uno o varios genes de distintos tipos (oncogenes, genes supresores, genes de susceptibilidad) y la posterior selección clonal de células portadoras de dichas mutaciones, aumentando su capacidad de proliferación e invasión (12,13).

La transformación maligna de las células inicia con una mutación individual en una sola célula del organismo, al favorecer el incremento de la tasa de crecimiento de la célula portadora en relación a las células adyacentes, contribuyendo a la aparición y selección de una nueva célula clonal con una alta capacidad de división, es decir, la clonalidad se refiere a que todas las células cancerosas se originan normalmente de una célula primigenia mutada (12,13).

Existen varias teorías del desarrollo del cáncer, una de estas teorías explica que un tumor se deriva de la división de una sola célula monoclonal transformada por mutaciones genéticas; el análisis molecular en las células tumorales ha demostrado su origen clonal, como en la LMC, por la identificación del cromosoma Filadelfia (3). El producto de este gen de fusión, se identifica como un componente de una vía de señalización o en la interacción con varias vías de señalamientos intracelulares de regulación transcripcional, metabólicas, programación funcional, entre otros (3,14).

Según Benítez, et al. un proceso canceroso no está determinado solo por la sucesión de mutaciones específicas de varios genes, por el contrario, estos productos génicos convierten vías de señalización intracelular en vías oncogénicas que dirigen a una iniciación y progresión del cáncer que también se ve afectado por diversos factores como la respuesta inmunológica, el tipo de alimentación, el microambiente tisular y la edad (3).

2.1.2. Leucemia

Las leucemias conforman un grupo heterogéneo de enfermedades malignas de las células troncales hematopoyéticas caracterizadas por una proliferación clonal descontrolada, una reducción gradual en su capacidad de diferenciación provocando una disrupción de la función hematopoyética normal (4,8,11).

Según Vives, las leucemias son proliferaciones tumorales que se originan a partir de precursores inmaduros linfoides, mieloides o stem cells (células troncales) con capacidad de diferenciación (es decir que pueden sufrir cambios en su citología originando numerosos tipos celulares que forman parte del organismo), inhibiendo una correcta hematopoyesis, existiendo disminución en las tres líneas celulares (eritrocítica, leucocitaria y trombopoyética) (15).

Cuando una célula sufre un cambio genético en donde se ven alterados procesos como la regulación de la proliferación y diferenciación celular, la autorrenovación, supervivencia, regulación del control del ciclo celular y reparación del ADN, se origina una producción de células anormales, que ocupan paulatinamente la médula ósea normal y como resultado provoca anemia progresiva, hemorragia y predisposición a infecciones. Por otra parte, cuando las células anormales irrumpen otros tejidos, ocurren disfunciones orgánicas específicas, como por ejemplo la infiltración al sistema nervioso central que sucede en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) (15,16).

2.1.3. Clasificación

La clasificación de las leucemias es compleja y ha cambiado a través de los años.

Si se producen cambios en las células de la médula ósea que normalmente origina a los glóbulos rojos, ciertos tipos de glóbulos blancos y plaquetas, la leucemia es mielógena o mielóide, por el contrario, si el cambio canceroso tiene lugar en un tipo de célula de la médula ósea que forma linfocitos, es un tipo de leucemia linfocítica o linfoblástica (17).

Desde el punto de vista de la epidemiología descriptiva, la leucemia se presenta usualmente en cuatro tipos básicos: leucemia mieloide aguda (LMA); leucemia mieloide crónica (LMC); leucemia linfoblástica aguda (LLA), y leucemia linfocítica crónica (LLC), sin embargo, esta última se considera hoy en día como un linfoma No Hodgkin (15,17).

Tradicionalmente, las leucemias se clasifican siguiendo criterios exclusivamente morfológicos e histoquímicos, establecidos por el grupo cooperativo Franco americano-británico (FAB).

Tabla 1. Clasificación de las Leucemias del grupo Franco americano-británico (FAB)			
Tipo	Definición	Frecuencia	Características
LMA			
M0	No diferenciada	2-5%	Leucemia mieloblástica aguda con mínima diferenciación mieloide. Células indiferenciadas. Su diagnóstico se establece con citoquímica ultra estructural o marcadores inmunológicos.
M1	Sin maduración	15-20%	Leucemia mieloblástica aguda con pobre diferenciación mieloide. Células indiferenciadas con sólo alguna granulación citoplasmática esporádica.
M2	Con maduración	25-30%	Leucemia mieloblástica aguda con diferenciación mieloide. Predominio de células con granulación citoplasmática. Diferenciación hasta estadio de promielocito. Puede observarse alguna célula de hábito monocitoide y alguna con bastones de Auer.
M3	Promielocítica	10-15%	Leucemia promielocítica aguda típica o hipergranular. Predominio de promielocitos hipergranulares con granulación azurófila que puede ocultar la basofilia citoplasmática y abundantes bastones de Auer

M4	Mielomonocítica	25-30%	Leucemia mielomonocítica aguda. Semejante a las M1 y M2 pero con más del 20% de promonocitos y monocitos.
M5	Monocítica	10-15%	Leucemia monocítica aguda. Algo más diferenciada que la M5A con núcleo de morfología muy irregular.
M6	Eritroblástica	3-4%	Eritroleucemia. Predominio de precursores eritroblásticos con rasgos megaloblásticos y frecuente multinuclearidad, junto a mieloblastos.
M7	Megacarioblástica	1%	Leucemia megacariocítica. Morfología variable con rasgos que pueden pasar inadvertidos con microscopía óptica convencional. Habitualmente diagnosticada por marcadores inmunológicos.
LLA			
L1		Adultos 31% Niños 80%	Blastos pequeños con escaso citoplasma y poca variación de tamaño y forma de célula a célula. El núcleo es redondo y habitualmente con un único nucléolo pequeño.
L2		Adultos 60% Niños 17%	Células blásticas más grandes y con citoplasma más abundante que en la L1. Tamaño y forma de las células muy heterogéneos. El núcleo puede tener una forma irregular y con frecuencia tiene múltiples nucléolos.
L3	Burkitt	Adultos 9% Niños 3%	Células grandes con citoplasma intensamente basófilo y con frecuencia vacuolado. Núcleo redondo de cromatina fina y nucléolo basófilo a menudo múltiple. Esta morfología es común a la leucemia asociada al linfoma de Burkitt.

(15)

2.1.4. Etiopatogenia

Las leucemias se caracterizan por la proliferación de progenitores hematopoyéticos que infiltran la médula ósea e impiden el normal crecimiento y la diferenciación de las células hematopoyéticas normales. La mayoría de las veces invaden también la sangre periférica y en algunos casos otros órganos (17).

Este proceso puede desarrollarse de manera más o menos rápida, aunque en general es progresiva y requiere cierto tiempo para que se inicien las manifestaciones clínicas. La invasión de la médula ósea por los blastos leucémicos suele ser causa de insuficiencia medular con aparición de pancitopenia clínicamente evidenciada por anemia, púrpura o petequias y fiebre. Junto a los síntomas anteriores, suele aparecer un síndrome tóxico con astenia, anorexia pérdida de peso. Algunas veces, especialmente en las leucemias de origen linfoide, puede observarse también un síndrome tumoral con hepato-esplenomegalia, adenopatía y dolores óseos (17).

Aunque el proceso de la leucopoyesis no está definido por completo, en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de los mecanismos que originan la transformación maligna de las células precursoras hematopoyéticas. En lo que respecta a las leucemias agudas, el hallazgo de alteraciones cromosómicas específicas y las contribuciones de las técnicas de biología molecular han permitido descubrir que un mecanismo fundamental del origen de la leucemia es la alteración de los protooncogenes; cuando estos genes sufren una lesión, el crecimiento y diferenciación celular se verán afectados, lo que constituye la transformación neoplásica de las células monoclonales, en este caso precursores inmaduros de la hematopoyesis (1,17).

Son varios los mecanismos por los que se puede alterar la actividad de los protooncogenes y convertirse en oncogenes. Los principales son las mutaciones puntuales que es el cambio de un nucleótido en la secuencia del ADN que constituye el proto-oncogén, una amplificación génica que consiste en formar múltiples copias de un proto-oncogén, translocación cromosómica que es el cambio de una porción del cromosoma, mutagénesis insercional cuando la célula se infecta con un virus que posee un gen promotor, transducción viral y la hipometilación. Ejemplos de ello es la translocación $t(8;14)$, la $t(8;22)$ que ocurren en el linfoma de Burkitt y en la leucemia aguda linfoblástica de fenotipo B maduro respectivamente. Alteraciones estructurales de estos genes como el caso de los protooncogenes de la familia ras (N-ras, K-ras y H-ras), cuyas mutaciones



puntuales se han encontrado en los casos de leucemias mielomonocíticas crónicas y otros síndromes mielodisplásicos, así como en LMA (leucemia mieloblástica aguda) (1,15).

Otro mecanismo del origen de la leucemia es la alteración de los genes supresores de tumores. En condiciones normales, estos genes regulan la actividad de los protooncogenes, por tanto, ya sea por mutación, translocación o delección esta variación de los genes supresores determinaría una actividad incontrolada de los protooncogenes, lo que se traduciría en la transformación neoplásica de una célula clonal. El gen supresor más conocido es p53 siendo detectado en pacientes con leucemia mieloide crónica, leucemia aguda y leucemia linfocítica crónica, entre otro tipo de neoplasias (1,15).

Un factor de riesgo se define como aquello que incrementa la posibilidad de desarrollar una enfermedad, para las leucemias existen dos tipos, las modificables como el tabaquismo, exposición a sustancias químicas, medicamentos de quimioterapia, la exposición a los campos electromagnéticos, desordenes sanguíneos, infecciones virales, ingesta dietética, y las no modificables como la edad, sexo, antecedentes familiares y síndromes genéticos como el Síndrome de Down (10).

2.1.5. Diagnóstico

La evidencia clínica es de vital importancia ante la sospecha diagnóstica de las leucemias complementado con el análisis del laboratorio clínico en la citometría hemática completa, la observación del frotis de sangre periférica (identificación de células anormales y principalmente las leucémicas). Las alteraciones de los resultados del laboratorio que requieren de una revisión especial incluyen: Anemia, leucopenia o leucocitosis, trombocitopenia y pancitopenia (18).

El aspirado de médula ósea es indispensable para el diagnóstico de la leucemia en donde debe existir un 20% de blastos para establecer un criterio de esta enfermedad. En el mismo procedimiento se obtendrá muestras para la posterior clasificación de la enfermedad, además de solicitar un cariotipo e inmunofenotipo, ya que en la actualidad el criterio citomorfológico es importante, pero ya no suficiente (18).

2.1.6. Leucemia mieloide crónica

La leucemia mieloide crónica es una enfermedad mieloproliferativa clonal con un defecto genético conocido como cromosoma Filadelfia (CrPh) de la célula troncal pluripotencial

que altera a las células megacariocíticas y mieloides eritroides; la clonalidad se ha demostrado en estudios citogenéticos, moleculares en un 90% de los casos (15,16,19).

El padecimiento se caracteriza por una anomalía citogenética que se conoce como cromosoma Filadelfia que se encuentra asociado al gen de fusión BCR-ABL, el cual es un reflejo del intercambio del material genético entre los cromosomas 9 y 22, el cual se encuentra en la célula troncal pluripotencial y genera una oncoproteína, dependiendo del sitio en donde se produce la translocación se originan tres isoformas p190 , p210 y p230 con actividad tirosina cinasa, considerada generalmente como iniciadora de la fase crónica del padecimiento, estas isoformas originan la leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crónica y leucemia neutrofílica crónica respectivamente. Las células BCR-ABL positivas poseen características biológicas como una proliferación aumentada, disminución en su apoptosis y variación de la adherencia a la matriz extracelular (15,16,19).

2.1.7. Leucemia linfocítica aguda

La LLA es caracterizada por una proliferación anormal y presencia de una población clonal de células linfoides; es la neoplasia hematológica más común en la infancia con mayor incidencia en niños de dos y cinco años y corresponde al 25% de todos los cánceres en este rango de edad (20,21).

Se han identificado síndromes genéticos que pueden predisponer al desarrollo de la LLA entre ellos se encuentran el síndrome de Down, la anemia de Fanconi, el síndrome de Bloom; otros de los factores predisponentes son la exposición a radiaciones ionizantes, pesticidas, ciertos virus (virus de Epstein-Barr, virus de inmunodeficiencia humana) o solventes (20,21).

Las aberraciones cromosómicas características de esta enfermedad incluyen t (12; 21) [ETV6-RUNX1], t (1;19) [TCF3-PBX1], t (9;22) [BCR-ABL] se observan mutaciones activadoras de quinasas en el 90% de la LLA tipo Ph (20).

Las manifestaciones clínicas más comunes de la LLA es la acumulación de células linfoides malignas y con diferenciación aberrante dentro de la médula ósea y en la sangre periférica; su presentación puede ser inespecífica identificándose síntomas de una insuficiencia de médula ósea (anemia, trombocitopenia, leucopenia), los síntomas más comunes son fiebre, pérdida de peso, sudores nocturnos, así como sangrado, equímosis, fatiga, disnea e infección (20,22).

2.1.8. Cromosoma Filadelfia

Se denominó con este nombre debido a que en el año 1960 los científicos Peter Nowell y David Hungerford residían en Filadelfia y en esta ciudad, aun trabajando en laboratorios diferentes, los dos descubrieron la anormalidad en el cromosoma, de ahí el origen de su nombre, señalaron que su formación es debido a la translocación recíproca de material genético entre el cromosoma 9 en la banda q34 y el cromosoma 22 en la banda 11; esta translocación se designa como t (9;22) (q34; q11) (1,8).

Normalmente el gen ABL codifica una proteína con actividad tirosina cinasa, que cumple con la función del control y proliferación celular, por el contrario, cuando se produce la fusión de estos genes la actividad tirosina quinasa se ve aumentada, favoreciendo una proliferación neoplásica de las células hematopoyéticas (1,8,23).

La translocación 9;22 ocasiona la formación de un nuevo gen híbrido que comprende las secuencias del gen c-ABL en el cromosoma 9 y el gen BCR en el cromosoma 22, formando el gen BCR-ABL. La proteína codificada por este nuevo gen híbrido, alterada de forma estructural, difiere del producto codificado por el gen c-ABL en peso molecular y en su actividad tirosina cinasa. De acuerdo al sitio de unión se pueden producir 3 tipos de proteínas de fusión: Mayor (M-BCR) de 210 kd encontrada típicamente en LMC; Menor (m-BCR) de 190 kd observadas más a menudo en la LLA Ph (+) y Micro (μ -BCR) de 230 kd, en pacientes que padecen leucemia neutrofílica crónica (1,8,24).

Se ha demostrado que, cuando hay una progresión de una fase crónica a una fase aguda blástica o ambas, con frecuencia se acompaña de manifestaciones citogenéticas adicionales. La más común incluye la presencia de un segundo cromosoma Filadelfia, trisomía 8 (+8); estas anomalías son más frecuentes en las transformaciones mieloides en relación a las linfoides (1,8,24).

Existe un mosaico para el cromosoma Filadelfia, (células con presencia y ausencia de cromosoma Ph); esto es común en la leucemia mieloide crónica; se ha considerado que este fenómeno de mosaico se evidencia en 20 al 25% de las células en fases tempranas de la enfermedad (1,8).

La leucemia mieloide crónica, puede aparecer a cualquier edad; representa de 15 a 20% de leucemias en los adultos y menos del 5% en los niños. La edad media al momento del



diagnóstico es de 50 años siendo la proporción de hombres y mujeres relativamente igual. La primera fase de la enfermedad, conocida como la fase crónica, evoluciona a la segunda fase más aguda o conocida como fase acelerada, que por último se transforma en la forma blástica o terminal la cual es semejante a un cuadro de leucemia aguda (15,16).

2.1.9. Etiología

En relación con el origen de la enfermedad, no se conocen factores ambientales o genéticos que incrementen el riesgo de padecer la enfermedad (15).

En el 85% de los pacientes, se diagnostica la enfermedad en la fase crónica siendo los síntomas iniciales inespecíficos caracterizados por astenia, hiporexia, pérdida de peso, fiebre y diaforesis nocturna. Puede haber manifestaciones relacionadas con la esplenomegalia, dolor en el hipocondrio izquierdo, sensación de plenitud postprandial. Sin embargo, existen otras menos frecuentes como dolores óseos, hemorragia, litiasis renal, gota. En la actualidad, el 40% de los casos es asintomático al momento del diagnóstico (21).

En la exploración física se observa la esplenomegalia en un 80 y 90% de los casos y un tercio de los pacientes se detecta hepatomegalia moderada (15,21).

2.1.10. Evolución y pronóstico

Posterior a un tiempo promedio de 4 años, ocurre un cambio brusco durante el curso de la enfermedad. De acuerdo a las características morfológicas, citogenéticas y respuesta al tratamiento quimioterapéutico se denomina como fase crónica, caracterizada por la presencia de células blásticas de estirpe mieloide en sangre periférica, medula ósea o ambas. En ausencia de estos cambios, la presencia de fiebre, hepatoesplenomegalia, dolor osteoarticular y un recuento diferencial leucocitario con basofilia persistente, anemia, trombocitopenia son criterios que sugieren una crisis blástica (17,18).

Al establecer una clasificación pronóstica en pacientes con LMC, se seleccionan pacientes aptos para ser sometidos a una terapia invasiva aplicable en pacientes jóvenes y adultos. La edad, recuento plaquetario, porcentaje de células blásticas en sangre periférica, niveles de LDH, recuento diferencial de leucocitos, glóbulos rojos nucleados



y presencia de alteraciones citogenéticas adicional al cromosoma Philadelphia, son aspectos de valor pronóstico (17,18).

2.1.11. Diagnóstico molecular

2.1.11.1. Reacción en cadena a la polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se ha considerado como una herramienta diagnóstica que ha empleado las bondades de la biología molecular con la finalidad de alcanzar gran valor y versatilidad como una técnica de análisis, adaptabilidad y aplicabilidad (25).

La reacción en cadena a la polimerasa o PCR es una reacción enzimática que tiene por objetivo la amplificación selectiva de una secuencia específica de material genético durante varios ciclos repetidos donde la secuencia blanca es fielmente copiada, a partir de cebadores constituidos por 18-25 nucleótidos complementarios con las regiones que se desean amplificar, dichos cebadores actúan en la síntesis *in vitro* del DNA (25,26).

En el caso de emplear ADN complementario (DNAc) proveniente del RNAm (ácido ribonucleico mensajero) se conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR). Esta conversión se logra mediante transcripción reversa controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el RNAm en una molécula de DNAc, el cual se utiliza al analizar cuando la expresión del RNAm de algún gen de interés (7).

2.1.11.1.1. Elementos que influyen en la reacción

➤ ADN molde

Constituida por la secuencia de DNA que se desea amplificar, la cantidad requerida mínima es de 20ng cuando se utiliza ADN que proviene de células eucariotas. El molde genómico también puede ser ARN previamente transformado en DNAc (ADN complementario) mediante la actividad enzimática de la transcriptasa reversa. (25) En PCR, el templado son las cadenas de DNA que son separadas y funcionan como molde para que la enzima pueda sintetizar las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés (7).



➤ **Taq polimerasa**

Es una enzima que deriva de una bacteria termófila denominada *Thermus aquaticus*, la cual es capaz de vivir en un ambiente hostil a niveles de temperatura muy altas, por esta razón su ADN polimerasa es capaz de resistir ese tipo de temperaturas. El rasgo distintivo de esta enzima bacteriana de otras ADN polimerasas de otros organismos es su capacidad de mantenerse viable y funcional a temperaturas altas, por lo que se le considera una enzima termoestable (7).

➤ **Primers**

Los primers o cebadores son secuencias de oligonucleótidos que delimitan la zona de ADN a amplificar. Su tamaño es variable, están conformados por secuencias cortas normalmente de 18 a 22 y el contenido de Guanina-Citosina constituye el 40-75% de la secuencia. En el caso de superar dicho porcentaje existe la probabilidad de generar productos inespecíficos (dímeros de primers) lo cual repercute en el curso y la especificidad de la reacción (25).

Los primers ideales son dos secuencias distintas pero complementarias entre sí. Una denominada “forward” (sentido) y otra “reward” (anti sentido); diseñadas con la finalidad de hibridar con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5’-3 (28) generando así amplicones de la secuencia específica de DNA(25).

➤ **Desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs)**

Son bases nitrogenadas que se requieren para la formación de las nuevas cadenas de ADN, al ser factores que contribuyen a la especificidad de la reacción, la concentración de los (dNTPs) empleada se encuentra entre 0,2 a 1Mm (28). La variabilidad de estos parámetros induce la disminución de la actividad enzimática de la Taq polimerasa afectando la fidelidad de la reacción. Los dNTPs pueden captar iones de magnesio (Mg^{2+}) por lo que las concentraciones de ambos elementos deben guardar siempre la misma relación (25).

➤ **Solución tampón (buffer)**

Es una solución amortiguadora capaz de mantener el pH adecuado para el funcionamiento óptimo de la ADN polimerasa; constituida por Tris-HCl (pH=8,4 a 25 °C) con una



concentración inferior a 1X, KCl, y MgCl₂. Entre los coadyuvantes que más se utilizan se encuentran: los detergentes como el Tween 20 o el Tritón X-100 que estabilizan la enzima y por lo tanto la reacción y el dimetilsulfóxido (DMSO) que reduce las estructuras secundarias del ADN (25).

➤ **Iones divalentes y monovalentes**

Los iones divalentes funcionan como cofactores de la enzima, cumpliendo una función crítica en la reacción. En la PCR, se emplea Mg²⁺, agregado generalmente como cloruro de magnesio (MgCl₂); la concentración requerida oscila entre 0,5 y 2,5mM. Por lo general, las bajas concentraciones disminuyen el rendimiento por el contrario su exceso puede originar amplificaciones inespecíficas (25).

➤ **Agua**

El agua actúa como disolvente en la reacción enzimática, es necesario que sea desionizada grado molecular, libre de nucleasas (DNasas y RNasas) y enzimas que degradan los ácidos nucleicos (28). Para un mejor rendimiento se aconseja una purificación por luz ultravioleta, ozono o 0,1% de dietilpirocarbonato (25).

➤ **Régimen de ciclaje**

El proceso de amplificación del material genético comprende las siguientes etapas que se repiten a lo largo de varios ciclos.

✓ **Desnaturalización**

La hélice complementaria del DNA se separa por calor al aplicar temperaturas que oscilan entre 90 a 97 °C durante 20-30 segundos produciendo la rotura de puentes de hidrógenos intracatenarios de la doble cadena. La separación completa de las hebras se consigue manteniendo la temperatura constante durante un tiempo determinado, sin embargo, el DNA se separa de forma parcial volviendo a su forma original (renaturalización) (7).

Cabe destacar que el tiempo depende de secuencias del templado, es decir si la cantidad de Guanina-Citosina es elevada, es necesario más tiempo para romper las uniones intracatenarias del material genético, del mismo modo, depende la velocidad en la que el

termociclador incrementa la temperatura, al finalizar la etapa las cadenas separadas servirán como templado para hibridarse con los primers correspondientes (7).

✓ Hibridación

Denominada como fase de emparejamiento, en esta etapa una vez que el DNA se haya desnaturalizado, la temperatura disminuye alrededor de los 40 a 60 °C para producir la unión de los cebadores a las secuencias del fragmento que se desea amplificar. Los primers se añaden en exceso al DNA que se amplifica para hibridar las dos hebras opuestas orientados en sus extremos 3', de tal manera que la polimerasa actúe en dirección 5' → 3', la temperatura requerida depende de la especificidad de cada cebador, tanto la longitud como la secuencia de los mismos son críticas para determinar los parámetros de una amplificación (7). Si tanto la temperatura como el diseño de los primers son los correctos, la estabilidad y especificidad del complejo será mucho mejor (7).

✓ Extensión o elongación

En esta fase, la actividad enzimática de Taq polimerasa interviene sobre el complejo templado-primers e inicia su función catalítica agregando dNTP's complementarios con la finalidad de generar las cadenas complementarias de DNA, por tanto, la extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' → 3'. La temperatura óptima de la reacción es 72 °C. Al finalizar el ciclo se habrán formado los amplicones con un tamaño determinado por el número total de pares de bases (pb) (7).

➤ Detección del producto amplificado

El método convencional para la detección del producto amplificado (amplicones) consiste en la separación y la visualización mediante electroforesis en geles de agarosa (29). La electroforesis consiste en la separación de moléculas de alto peso molecular (DNA) a través de una matriz sólida que actúa como una especie de filtro de separación en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica de cada molécula. Esta separación se realiza bajo un tampón o buffer (TAE o TBE) (7).

Los diferentes fragmentos de DNA o RNA pueden ser visualizados directamente en el gel de agarosa mediante tinción con bromuro de etidio, un agente intercalante fluorescente

capaz de unirse a las bases del material genético. De esta manera, los complejos son excitados con luz ultravioleta, emiten una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas. Cuando los amplicones son corridos en el gel, serán cargados junto a un marcador molecular, este debe tener un número conocido de segmentos de ADN con el objetivo de facilitar la identificación de los ampliaciones (7).

Por último, la visualización de los amplicones se efectúa al capturar una foto digital del gel de agarosa que se encuentra expuesto a luz UV, los fragmentos más pequeños de DNA migrarán con mayor rapidez en el gel, una característica importante de los geles es su alto nivel de resolución que permiten distinguir fragmentos que difieren en un solo nucleótido, aun cuando su secuencia este compuesta por varios pares de bases (7,5).

2.1.11.2. PCR tiempo real

PCR en tiempo real es una técnica que permite la amplificación de ADN en bajas concentraciones a billones de copias de esta. Presenta alta especificidad y un amplio rango de detección. Para realizar una PCR tiempo real se emplean los mismos reactivos de un PCR punto final pero la detección y análisis de los productos de amplificación es diferente porque en esta técnica se añade un fluoróforo (7).

Para las determinaciones cuantitativas se necesita obtener el número de moléculas de ARNm para lo cual se realiza una reacción de transcripción reversa del ARNm a ADNc antes de aplicar la PCR en tiempo real, este procedimiento se le denomina como retrotranscripción, posteriormente se realiza la amplificación del ADN en un termociclador que monitoriza la señal emitida por los fluoróforos usados en la detección del producto obtenido conforme transcurra la reacción. La fluorescencia aumenta directamente con la cantidad del producto amplificado por esta razón es un método que en un sólo paso puede combinar la amplificación y la detección (7,25).

La técnica de PCR tiempo real permite caracterizar los transcritos que se originan por las translocaciones que se producen en las leucemias, identifica los puntos de ruptura en las regiones de los genes BCR y ABL, en donde los genes producidos por los diferentes rearrreglos genómicos, producen un fenotipo, es decir manifestaciones clínicas de la leucemia mieloide crónica y la leucemia linfocítica aguda (7,25,27).



Para el análisis del gen de fusión BCR-ABL por PCR en tiempo real se emplea termocicladores, equipos que se encuentran conectados a una computadora que a su vez tienen un software, éste genera gráficas, una de ellas es la de amplificación que muestra el curso y el progreso de la reacción, otra gráfica es la curva melting o curva de disociación, que indica la especificidad de la reacción (7,28).

Existen dos tipos de cuantificación: La absoluta que se emplea para conocer el número exacto de copias amplificadas del blanco o la concentración de ácidos nucleicos en una muestra y la cuantificación relativa evalúa los cambios en la expresión de genes, los mismos que se basan en los niveles del ARNm del gen blanco comparados con un gen de referencia (7).

La translocación BCR-ABL t (9;22) se ha encontrado en el 95% de los casos de leucemia mieloide crónica (LMC) en adultos, así como el 25% en casos de leucemia linfocítica aguda (LLA). El reordenamiento genera una fusión de transcripción de los genes BCR (breakpoint cluster region) con ABL (abelson breakpoint leukemia), dando como resultado una tirosina cinasa que transforma células normales en neoplásicas causando así una propagación ilimitada de leucocitos. Las transcripciones de fusión b3a2 y b2a2 (M-bcr) y e1a2 (m-bcr) se encuentran expresados en más del 95% de los casos. El exón de fusión más común es a2 del gen ABL, mientras que el exón de fusión a3 es más raro. Además del análisis FISH (Hibridación fluorescente in situ), el método de diagnóstico más aceptado está basado en la transcripción reversa por PCR en tiempo real que determina las transcripciones de fusión (27,29,30).



CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Determinar la frecuencia del cromosoma Filadelfia en pacientes de SOLCA con diagnóstico de leucemia en el periodo 2014-2018.

3.2. Objetivos específicos

- Relacionar la presencia del cromosoma Filadelfia con las variables: edad, sexo y procedencia de los pacientes diagnosticados con leucemia.
- Relacionar la presencia del cromosoma Filadelfia de acuerdo al tipo de leucemia empleando los resultados obtenidos a partir de las historias clínicas de cada paciente.



CAPÍTULO IV

4. METODOLOGÍA

4.1. Tipo de Estudio

El estudio es de tipo descriptivo transversal.

4.2. Área de estudio

El área de estudio está conformada por las historias clínicas de pacientes con diagnóstico de leucemia del Instituto del Cáncer SOLCA - Cuenca.

4.3. Ubicación geográfica

La Sociedad de Lucha Contra el Cáncer (SOLCA) está ubicada en la provincia del Azuay, cantón Cuenca en la Avenida del Paraíso y Agustín Landívar.

4.4. Universo y muestra

El universo estuvo conformado por todas las historias clínicas de los pacientes que hayan sido diagnosticados con leucemia en el Instituto del Cáncer SOLCA - Cuenca. La muestra empleada para el estudio contempla la totalidad de pruebas PCR realizadas para la detección del gen de fusión BCR-ABL en pacientes diagnosticados con leucemia en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto del Cáncer, SOLCA – Cuenca; durante el periodo 2014-2018.

4.5. Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de Inclusión

- Historias clínicas de pacientes con diagnóstico de leucemia en el período 2014-2018.
- Historias clínicas de pacientes con leucemia que se realizaron la prueba molecular para la detección del gen de fusión BCR-ABL.

Criterios de Exclusión

- Historias clínicas de pacientes con diagnóstico diferente al de leucemia.
- Historias clínicas incompletas.
- Historias clínicas de pacientes con diagnóstico de leucemia antes o después del periodo 2014- 2018.

4.6. Variables del estudio

- **Variables dependientes:** Cromosoma Filadelfia.
- **Variables independientes:** edad, género, procedencia, tipo de leucemia.

4.7. Operacionalización de variables

Ver anexo 1.

4.8. Método, técnicas e instrumentos

- **Métodos:** Análisis de los datos demográficos y variables clínicas y de laboratorio de cada paciente obtenida de su historia clínica.
- **Técnicas:** La información requerida para la presente investigación fue recolectada de cada una de las historias clínicas de los pacientes con diagnóstico de leucemia sometidos a la prueba molecular para la expresión del gen de fusión BCR-ABL, aplicando un formulario donde se especifica cada uno de los parámetros necesarios para el análisis de datos.
- **Instrumentos:** Los datos serán recopilados utilizando la base de datos obtenida del sistema de información de Solca-Cuenca. (**Anexo 2**).

4.9. Procedimiento

- **Autorización:** Para el estudio se envió una solicitud de autorización al director del Instituto del Cáncer SOLCA-Cuenca. Una vez aprobado el consentimiento se procedió a obtener la información a partir de la base de datos (**Anexo 3**).
- **Capacitación:** Previo al estudio, se consultó bibliografías de uso y actualizadas, relacionadas con la leucemia y su diagnóstico en el laboratorio clínico.
- **Supervisión:** El presente estudio estuvo bajo la supervisión del Dr. Gabriele Bigoni, docente de la Universidad de Cuenca.

4.10. Plan de tabulación y análisis

Para la tabulación y análisis de los datos recolectados se utilizó el programa SPSS y Microsoft Excel para crear gráficos y tablas así como para la interpretación de los resultados. La relación entre a las variables cualitativas y los datos demográficos, fueron analizados a través de frecuencias y porcentajes y presentados por medio de tablas simples y cruzadas. Para la asociación entre las variables se aplicó la razón de prevalencia con un intervalo de confianza del 95% y el valor de P, para formar una asociación y significancia estadística.

Los resultados se expresan en medidas de frecuencia absoluta y porcentual; para establecer la relación entre variables se utilizó dos perspectivas, la primera con la aplicación de estadístico Chi- cuadrado que se utiliza en variables con más de dos categorías y para las variables dicotómicas se utilizó un segundo estadístico que es el OR (Odds Ratio) y se consideró una significación estadística del 5% ($\alpha=0.05$; $p<0.05$).

4.11. Consideraciones bioéticas

- **Confidencialidad:** Los datos obtenidos de esta investigación fueron manejados con absoluta confidencialidad, manteniendo el anonimato de las identidades de los historiales utilizados y siendo únicamente accesibles para las personas a cargo de este estudio.

- **Balance riesgo-beneficio:** La investigación tuvo un riesgo mínimo, en lo referente a la posibilidad de que los datos obtenidos se pudieran filtrar a terceras personas y ser usada para otros fines.



El beneficio del estudio fue el de obtener estadísticas actualizadas en relación a la frecuencia y asociación de la expresión de BCR-ABL en las leucemias y diferentes factores de riesgo en nuestro medio, siendo un aporte importante a los profesionales de la salud.

- **Conflicto de intereses:** Declaramos no tener ningún conflicto de interés, ya sea de tipo personal, económico, político o financiero que pueda influir en nuestro juicio, así como tampoco hemos recibido algún tipo beneficio de fuentes externas que pudieran tener interés en la información que se pueda obtener para el estudio.

- **Idoneidad de las investigadoras:** Al ser egresadas de la carrera de Laboratorio Clínico cumplimos con todos los requisitos y aprobaciones de asignaturas para la ejecución de dicha investigación.

CAPÍTULO V

5. RESULTADOS

La población total del estudio estuvo constituida por 307 registros de pacientes con diagnóstico de leucemia que se realizaron la prueba para la detección del gen BCR-ABL entre los años 2014-2018. La edad promedio se ubicó entre los 41 y 50 años de edad $n=67/307$ (21,8%). El sexo más frecuente fue el masculino $n=187/307$ (60,9%). La procedencia de mayor prevalencia fue la provincia del Azuay $n= 306/307$ (99,7%). La leucemia con mayor frecuencia fue la leucemia mieloide crónica (LMC) $n=284/307$ (92,5%) (**Tabla 1**).

TABLA 1
CARACTERIZACIÓN DE LOS 307 PACIENTES QUE SE REALIZARON LA PRUEBA DE DETECCIÓN DEL GEN BCR-ABL. SOLCA 2014-2018.

	N°	%
EDAD		
0-10 años	8	2,6%
11-20 años	12	3,9%
21-30 años	53	17,3%
31-40 años	61	19,9%
41-50 años	67	21,8%
51-60 años	60	19,5%
61-70 años	25	8,1%
71- 80 años	18	5,9%
81-90 años	3	1%
Total	307	100%
SEXO		
Femenino	120	39,1%
Masculino	187	60,9%
Total	307	100%
PROVINCIA		
Azuay	306	99,7%
Loja	1	0,3%

Total	307	100%
LEUCEMIA		
LLA	20	6,5%
LMA	3	1,0%
LMC	284	92,5%
Total	307	100%

Fuente: Base de datos SOLCA-Cuenca.

Elaborado por: Las autoras

Al analizar la frecuencia de la expresión del cromosoma Filadelfia en la población de estudio, se encontró que, en el año 2014 se registraron 46 casos positivos equivalente a un 15%, en el año 2015 se registró 39 casos (12,7%), en el año 2016 se rastrearon 47 casos (15,3%), en el año 2017 se identificó 73 casos (23,8%) y finalmente para el año 2018 se registró 85 casos (27,7%); notándose que a través de los años se ha incrementado tanto el número de casos positivos como el número de pruebas de detección del gen BCR-ABL, teniendo entonces un porcentaje similar en los tres primeros años con una media del 14,33% aumentando del año 2017 al 2018 a un promedio del 25,75% (**Tabla 2**).

TABLA 2
FRECUENCIA DE CASOS POSITIVOS Y NEGATIVOS PARA EL GEN BCR-ABL. SOLCA 2014-2018.

Año	Negativo		Positivo		Total	
	N	%	N	%		
2014	5	1,6%	46	15%	51	16,6%
2015	3	1%	39	12,7%	42	13,7%
2016	3	1%	47	15,3%	50	16,3%
2017	5	1,6%	73	23,8%	78	25,4%
2018	1	0,3%	85	27,7%	86	28,00%
Total	17	5,5%	290	94,5%	307	100%

Fuente: Base de datos SOLCA-Cuenca.

Elaborado por: Las autoras

De acuerdo a los datos recolectados, de las 307 historias clínicas ingresadas al estudio se pudo observar que existió un 94,5% de casos positivos para el gen de fusión BCR-ABL equivalente a 290 pacientes; frente a un 5,5 % de casos negativos presentado por 17 pacientes (**Figura 1**).

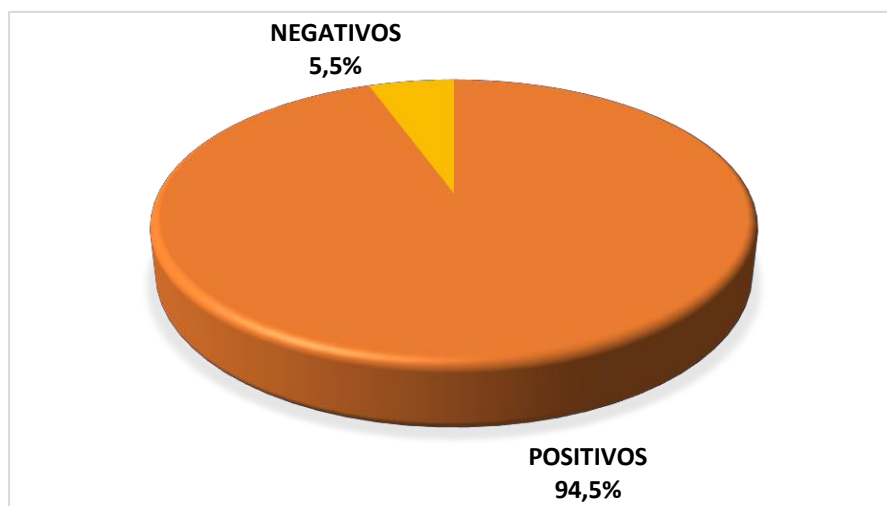


Figura 1. Frecuencia del gen BCR-ABL en pacientes con diagnóstico de leucemia en SOLCA en el periodo 2014-2018.

Fuente: Base de datos SOLCA-Cuenca.

Elaborado por: Las autoras

De los 290 casos positivos, la leucemia en donde se presentó un mayor número de casos de expresión del gen BCR-ABL fue la leucemia mieloide crónica (LMC) en las edades comprendidas entre los 41-50 años de edad con un porcentaje del 21,4% y entre los años 31-40 con el 19%; seguida de la leucemia linfocítica aguda entre los 0 – 10 y 11-20 años en un porcentaje del 2,1% para los dos rangos de edades, no se registraron casos positivos en la leucemia linfocítica crónica (LLC) (**Tabla 3**).

**TABLA 3: FRECUENCIA DE CASOS POSITIVOS PARA EL GEN BCR-ABL
SEGÚN LA EDAD Y EL TIPO DE LEUCEMIA SOLCA 2014-2018.**

Edad	LLA		LMA		LMC		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
0-10 años	6	2,1%	1	0,3%	0	0%	7	2,4%
11-20 años	6	2,1%	0	0%	7	2,4%	13	4,5%
21-30 años	5	1,7%	0	0%	46	15,9%	51	17,6%
31-40 años	1	0,3%	0	0%	55	19%	56	19,3%
41-50 años	0	0%	1	0,3%	62	21,4%	63	21,7%
51-60 años	0	0%	1	0,3%	54	18,6%	55	19%
61-70 años	2	0,7%	0	0%	23	7,9%	25	8,60%
71- 80 años	0	0%	0	0%	17	5,9%	17	5,9%
81-90 años	0	0%	0	0%	3	1%	3	1%
Total	20	6,9%	3	1%	267	92,1%	290	100%

Fuente: Base de datos SOLCA-Cuenca.

Elaborado por: Las autoras

La expresión del gen BCR-ABL se encontró con mayor frecuencia en el sexo masculino en un 57,7% con respecto al sexo femenino que se presentó en un 36,8%; sin embargo, no se encontró relaciones significativas ($p < 0,05$), lo que implica que el sexo no es un factor de riesgo para la expresión del gen BCR-ABL en pacientes con leucemia (**Tabla 4**).

TABLA 4: EXPRESIÓN DEL GEN BCR-ABL SEGÚN EL SEXO. SOLCA 2014-2018.

Sexo	Negativo		Positivo		OR (IC 95%)	P
	Nº	%	Nº	%		
Femenino	7	2,3%	113	36,8%	1,09 (0,41-2,96)	0,856
Masculino	10	3,3%	177	57,7%		

OR: Odds Ratio. IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

Fuente: Base de datos SOLCA-Cuenca.

Elaborado por: Las autoras

La procedencia de los pacientes fue dividida en dos grupos, en locales (Azuay) y externos (otros); la expresión del gen BCR-ABL se encontró con mayor frecuencia en la provincia del Azuay en un 94,1 %; sin embargo según el análisis estadístico se evidencia que no existe una relación significativa ($p < 0,05$) entre las mismas, lo que significa que, el lugar de procedencia tampoco es un factor de riesgo para la expresión de dicho gen (**Tabla 5**).

TABLA 5: EXPRESIÓN DEL GEN BCR-ABL SEGÚN EL LUGAR DE PROCEDENCIA. SOLCA 2014-2018.

Sexo	Negativo		Positivo		OR (IC 95%)	P
	Nº	%	Nº	%		
Local	17	5,5%	289	94,1%	0,944 (0,92-0,97)	0,808
Externos	0	0%	1	0,3%		

OR: Odds Ratio. IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

Fuente: Base de datos SOLCA-Cuenca.

Elaborado por: Las autoras

CAPÍTULO VI

6. DISCUSIÓN

La LMC puede ser determinada por características clínicas, hematológicas y morfológicas típicas cuando se interpreta en un contexto clínico y técnicas de diagnóstico adecuadas. Ikramdin Ujjan *et al.*, determinó que, en dicho proceso neoplásico de los 145 casos estudiados, 109 (75,1%) fueron hombres y 36 (24,8%) mujeres con una media de edad de $36 \pm 11,7$ años (31). Del mismo modo, estudios realizados en la universidad médica en Vellore, India, indican que el cromosoma Filadelfia se evidencia en una mayor proporción en pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide crónica (LMC), siendo el sexo masculino más representativo en relación al sexo femenino en un testeo de 1250 pacientes (32).

En una publicación realizada en Cuba se encontró que de 99 pacientes cromosoma filadelfia positivo el 52% pertenecía al sexo masculino y el 48% al sexo femenino (33), así mismo en una investigación realizada en Perú los datos son similares existiendo un predominio en hombres con el 61.7% frente a un 31.8% en mujeres (34), estos datos son similares a nuestro estudio; sin embargo, en contraste a lo antes mencionado, existen múltiples estudios en donde expresan lo contrario, hallándose un mayor número de casos en pacientes pertenecientes al sexo femenino; muestra de ello, la investigación efectuada en Colombia identificó alrededor del 51,6% de mujeres que expresaban este gen, frente a un 48,4% de casos en el sexo masculino (35); del mismo modo una investigación efectuada en Venezuela se demostró que la LMC con cromosoma filadelfia positivo, estaba presente en un 40% en hombres y en un 60% en mujeres (36). Se puede establecer entonces, que a pesar de que la mayor parte de los artículos científicos antes mencionados indican que la LMC es más común en el sexo masculino, esta variable no es un factor predisponente para la expresión del gen BCR-ABL.

Un estudio publicado por Fader indicaba que en pacientes con diagnóstico de LMC la presencia del gen de fusión BCR-ABL oscilaba entre las edades de 45 y 50 años, de la cual entre el 12-30% de los pacientes que fueron analizados eran mayores a 60 años (37); así mismo en Perú, una investigación realizada en el 2015 donde se estudió un total de 316 historias clínicas de pacientes con diagnóstico de LMC interesadamente, descubrió que el 55% se hallaban en edades comprendidas entre los 31 y 50 años de edad (34),



igualmente un grupo de investigadores en Cuba estudiaron a 99 pacientes con presencia del cromosoma Filadelfia, de los cuales el 56% se ubicaban en edades entre los 30 y 49 años (33). Estos resultados se asemejan a los obtenidos en nuestra investigación.

El Departamento de Patología de la Universidad de Ciencias Médicas y de la Salud de Liaquat, Jamshoro mediante RT-PCR, analizó en 133 casos la presencia de la expresión del gen BCR-ABL, resultando un 91,7% positivas mientras que 8,3% fueron negativas, demostrando una técnica de alta sensibilidad para la determinación del mismo (38). En la investigación realizada por Cesar Paz Y Miño *et al.*, sobre la frecuencia del reordenamiento del gen BCR- ABL demostraron que la expresión del transcrito BCR-ABL varía según el tipo de leucemia, en 40 pacientes con LMC, el 87,5% fueron Ph+, mientras que en 49 pacientes con LLA solo 12,2% fueron Ph+ (39).

Dichos estudios demuestran una relación entre la frecuencia de LMC y la expresión del gen de fusión BCR-ABL. Cabe mencionar que en las presentes investigaciones, las técnicas de diagnóstico se complementan con un estudio citogenético ya que se vuelve muy importante el análisis del cariotipo para corroborar la presencia del cromosoma filadelfia, sin embargo, encontramos no concordante dicho aporte ya que con los avances tecnológicos de la ciencia y la estandarización de técnicas de amplificación de material genético, estas brindan una mayor certeza y especificidad en el diagnóstico y análisis de enfermedades de carácter neoplásico.

Finalmente se puede indicar que debido a datos inexistentes y al no haber encontrado investigaciones que relacionen la frecuencia del cromosoma Filadelfia con respecto a cada uno de los cuatro tipos de leucemia en nuestra región, no se puede establecer una correlación siendo este trabajo el primero en su categoría a nivel nacional.

CAPÍTULO VII

7.1. CONCLUSIONES

Al finalizar la investigación y según los objetivos planteados concluimos que:

- La frecuencia del Cromosoma Filadelfia en pacientes de SOLCA con diagnóstico de leucemia en el periodo 2014-2018 fue del 94,5% equivalente a 290 pacientes, existiendo en el año 2018 el mayor número de casos positivos con un porcentaje del 27,7%.
- El grupo etario con mayor número de casos positivos perteneció a los pacientes comprendidos entre las edades de 41-50 años de edad con un porcentaje del 21,4% seguido del grupo de 31-40 años con el 19%.
- La mayor parte de pacientes con la expresión del gen BCR-ABL se identificó en el sexo masculino en un 57,7%, con respecto al sexo femenino, sin embargo, no se encontró una relación significativa por lo que no supone un factor de riesgo para la expresión de este gen.
- La mayoría de los pacientes Cromosoma Filadelfia positivo procedían de la provincia del Azuay con el 94,1 % con respecto a otra provincia del sur del Ecuador.
- El cromosoma Filadelfia se presentó con mayor frecuencia en la leucemia mieloide crónica (LMC) con el 92,1% seguida de la leucemia linfocítica aguda con un porcentaje del 6,9%.



7.2. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios similares en otras entidades de salud tanto públicas como privadas en donde efectúen la prueba para la detección del gen BCR- ABL, con la finalidad de conocer la frecuencia de este gen a nivel regional y nacional y su asociación con diferentes factores de riesgo, todo esto con el objetivo de mantener una actualización continua de datos, aportando información relevante de nuestra realidad.
- Realizar estudios prospectivos que se basen en la cuantificación de la expresión del gen de fusión, siendo un indicador para la evaluación de la eficacia del tratamiento para la leucemia.
- Realizar estudios en el que comparen la técnica de PCR tiempo real, la técnica de hibridación in situ (FISH) y citogenética convencional utilizadas para la detección del cromosoma Filadelfia, con el propósito de evaluar la especificidad y sensibilidad en cada una de estas técnicas.



CAPÍTULO VIII

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Puente J, De Velasco G. ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? [Internet]. Madrid: Sociedad Española de Oncología Médica; 2019 [citado] 2020 Enero 4. Disponible en: <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>.
2. Organización Mundial de la Salud. Cáncer. [Internet]. OMS; 2018 [citado] 2020 Enero 4. Disponible en: <https://www.who.int/topics/cancer/es/>.
3. Benítez E, Pérez A, Hinojosa Y. Bases evolutivas y ecológicas de la carcinogénesis humana ¿cuestión de mala suerte? Revista Cubana de Medicina Militar. 2018; 7(2):1-19.
4. American Cancer Society. Aspectos básicos del Cáncer. Texas: Sociedad Americana del Cáncer [Internet].; 2016 [citado] 2020 Enero 5. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>.
5. Chakravarthi B, Nepal S, Varambally S. Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer. The American Journal of Pathology. 2016; 187(7): 1724-1735.
6. Takeshima H, Yamada H, Ushijima T. Cancer epigenetis: Aberrant DNA metilacion in cancer diagnostic and treatment. Oncogenomics. 2019; 5(2): 65-76.
7. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo M. Fundamentos de la Reacción en Cadena a la Polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Mediagraphic. 2014; 2(2): 70-78.
8. Motlló C, Ribera J, Morgades M, Granada I, Montesinos P, Mercadal S, et al. Frequency and prognostic significance of additional cytogenetic abnormalities to the Philadelphia chromosome in young and older adults with acute lymphoblastic leukemia. Leukemia and Lymphoma. 2017; 59(1): 46-154.
9. Instituto Nacional del Cáncer. Leucemia. [Internet]. Estados Unidos: Instituno Nacional del Cáncer; 2019 [citado] 2020 Enero 2. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/leucemia>.
10. Internacional Agency for Research on Cancer. Globocan. [Internet]. Francia: OMS; 2018 [citado] 2020 Enero 5. Disponible en:

https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=904_218&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=15&.

11. Roberts K, Gu Z, Payne-Turner D, McCastlain K, Pei D, Iacobucci I, et al. High Frequency and Poor Outcome of Philadelphia Chromosome–Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *Journal of Clinical Oncology*. 2017; 35(4): 394-401.
12. Jackson A, Bowers H, Bandera E, Clinton S, Ggiovannucci E, Hursting S. The cancer process. *World Cancer Research Fund*. 2018; 1(3):3-40.
13. Ahmed M, Ahmed E. Theory of Cancer and Cancer Progression. *Omics*. 2015; 1(1):15-24.
14. Maonan W, Jingzhou Z, Lishen Z, Fang W, Yu L, Yingfeng W. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*. 2017; 8(5): 761-773.
15. Vives J, Aguilar J. *Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología*. 5^{ta} ed. Madrid: ElSevier; 2015.
16. Instituto Nacional de Cancerología de Colombia. Guía de práctica clínica para la detección, tratamiento y seguimiento de leucemias linfoblástica y mieloide en población mayor de 18 años. [Internet]. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 2017 [citado] 2020 Enero 8. Disponible en: http://gpc.minsalud.gov.co/gpc_sites/Repositorio/Conv_563/GPC_Leucemia_Mayores_18a%C3%B1os/LEUCEMIAS%20-%20profesionalesDIC29_WEB.pdf.
17. Palomo I, Pereira J, Palma J. *Hematología. Fisiopatología y Diagnóstico*. Chile: Universidad de Talca; 2009.
18. Gobindan R, Morgensztern D. *Manual de Washington de Oncología*. 3^{ra} ed. Missouri: Wolters Kluwer; 2016.
19. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic Myeloid Leukemia: 2018 update on diagnostic, therapy and monitoring. *American Journal of Hematology*. 2017; 93(3): 442-459.
20. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*. 2017; 7(6).

21. Soares A, Campos I, de Souza P, Fortes A, Viviane P, Ferreira M. Aspectos clínicos y epidemiológicos de las leucemias. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2017; 10(1):1-14.
22. American Cancer Society. Factores de riesgo para la leucemia linfocítica aguda. [Internet]. Texas: Sociedad Americana del Cáncer; 2018 [cited] 2019 Marzo 29. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-linfocitica-aguda/causas-riesgos-prevencion/factores-de-riesgo.html>
23. Leoni V, Biondi A. Tyrosine Kinase Inhibitors in BCR/ABL positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015; 100(3): 295-299.
24. Panuzzo C, Volpe G, Cibrario E, Casnici C, Crotta K, Crivellaro S, et al. New alternative splicing BCR/ABL-OOF shows an oncogenic role by lack of inhibition of BCR GTPase activity and an increased of persistence of Rac activation in chronic myeloid leukemia. *Oncoscience*. 2015; 2(10): 880-891.
25. Bolivar A, Rojas A, García P. PCR and PCR-Multiplex: critical parameters and standardization protocol. *Avances en Biomedicina*. 2014; 3(1): 25-33.
26. Lejona S, Benetti S, Fay F, Fay O. Avances en el diagnóstico molecular: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. *Anuario Fundación Dr. J.R. Villavicencio*. 2016; 1(14): 2-14.
27. Huang X, Li Y, Shou L, Li L, Chen Z, Ye X, et al. The molecular mechanisms underlying BCR/ABL degradation in chronic myeloid leukemia cells promoted by Beclin1-mediated autophagy. *Oncotarget*. 2019; 2(11): 2197-5208.
28. Qin Y, Huang X. Molecular Detection of BCR-ABL in Chronic Myeloid Leukemia. *Methods Molecular Biology*. 2016; 4(15): 1-15.
29. MOLBIOL. LightMix Kit bcr-abl t(9;22) and Abl Reference. Version 140115. Germany; 2014.
30. Hernández N, Lavauth K, Ruiz V. Patrones de hibridación del gen BCR / ABL1 en pacientes cubanos con leucemia. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología Y Hemoterapia*. 2016; 32(2): 215-222.
31. Ikramdin U, Akhund AA, Abdul M, Shah N. The cytogenetic and molecular analysis of chronic myeloid leukemia in a tertiary care hospital of Sindh, Pakistan. *Intergr Cancer Science Therapy*. 2015; 2(3):164-167.



32. Arun A, Senthamizhselvi, S, Mani K, Vinodhini N, Janet B, et al. Frequency of rare BCR-ABL1 fusion transcripts in chronic myeloid leukemia patients. *Internacional Journal of Laboratory Hematology*. 2016; 39(3):235-242.
33. Avila O, Expósito Y, González L, Espinosa E, Hernández C, Ramón L. Aspectos diagnósticos, evolutivos y terapéuticos de la leucemia mieloide crónica. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*:2014; 30(1):47-58.
34. Moreno L. Aspectos epidemiológicos y características clínico-hematológicas en pacientes diagnosticados con lmc (leucemia mieloide crónica) atendidos en el inen (instituto nacional de enfermedades neoplásicas) durante el periodo 2000-2009. [Internet]. Perú; 2015 [citado] 2021 Mayo 26. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/4367/Moreno_rl.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
35. Aya C, Torres J, Muskus C, Ramírez G, Cuervo J, Sierra M, et al. Frecuencia de los transcriptos p190BCR-ABL y p210BCR-ABL en una población colombiana con leucemia mieloide crónica (LMC) usando RT-PCR cualitativa. *Iatreia*: 2014; 27(4): 398-40.
36. Zadis J, Rojas A, Urdaneta K, Atencio R, Gonzalez R, Soto M, et al. Transcritos del gen BCR-ABL, en pacientes con leucemia mieloide crónica en Venezuela: Saber Universidad de Oriente. 2015; 27(3):422-429.
37. Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., & Kantarjian, H. The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*:1998; 341(3):164–172.
38. Ikram U, Anwar A, Muhammad S, Muhammad Q, Saeed K. Cytogenetic and Molecular Analyses of Philadelphia Chromosome Variants in CML (chronic myeloid leukemia) Patients from Sindh using Karyotyping and RT-PCR. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 2015; 31(4):936-940.
39. Paz y Miño C, Burgos R, Morillo S, Santos J, Fiallo FLP. BCR-ABL rearrangement frequencies in chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia in Ecuador, South America. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002; 132(1):65-7.

CAPÍTULO IX

9. ANEXOS

9.1. ANEXO 1: OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA
Edad	Período en el que transcurre la vida de un ser vivo, desde su nacimiento hasta el día de hoy.	Tiempo	Cédula de identidad	Numérica
Género	Cualidad fisiológica que diferencia al ser humano en hombre y mujer.	Biológica	Historia clínica	Hombre Mujer
Lugar de procedencia	Lugar de nacimiento	Área geográfica	Lugar registrado	Azuay Cañar Otro
Leucemia	Proliferaciones tumorales adquiridas que se originan en los precursores inmaduros linfoides o mieloides	Presencia o Ausencia de la enfermedad	Tipo de Leucemia	Leucemia linfocítica aguda Leucemia linfocítica crónica Leucemia mieloide aguda Leucemia mieloide crónica.
Cromosoma Filadelfia	Translocación recíproca de material genético entre el cromosoma 9 en la banda q34 y el cromosoma 22 en la banda q11	Presencia o Ausencia del gen de fusión BCR-ABL	Porcentaje de expresión del gen de fusión	Presencia o Ausencia del gen de fusión BCR-ABL.



9.2. ANEXO 2: FORMULARIO DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN
ANEXO 2



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

CROMOSOMA FILADELPHIA EN PACIENTES CON DX LEUCEMIA

Formulario N°: _____

1. INFORMACIÓN PERSONAL

- **EDAD:** _____ años
- **SEXO:** Masculino _____ Femenino _____
- **LUGAR DE PROCEDENCIA:** Provincia _____

2. DIAGNÓSTICO

LEUCEMIA

- Leucemia Mieloide Crónica ()
- Leucemia Linfocítica Crónica ()
- Leucemia Mieloide Aguda ()
- Leucemia Linfocítica Aguda ()

DETECCIÓN MOLECULAR MEDIANTE PCR

SI () NO ()

EXPRESIÓN DE BCR/ABL

_____ %



9.3. ANEXO 3 : OFICIO AL DIRECTOR DEL INSTITUTO DEL CANCER SOLCA- CUENCA

Cuenca, 29 de enero del 2021

Señor Doctor

Raúl Alvarado Corral

DIRECTOR DEL INSTITUTO DEL CÁNCER SOLCA-CUENCA

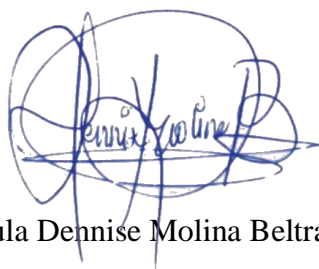
Su despacho.

De nuestra consideración:

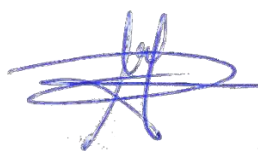
Con un cordial saludo nos dirigimos a usted, después de expresarle éxitos en sus funciones, con la finalidad de solicitar de la manera más comedida su autorización para que nosotras: **Paula Dennise Molina Beltrán con CI: 0302237714 y María del Carmen Nugra Sánchez con CI: 0106471451**, estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico, de la Facultad de Ciencias Médicas, podamos acceder a la base de datos del área de Biología Molecular del Instituto del Cáncer SOLCA-Cuenca, con el objetivo de recolectar información necesaria para realizar el proyecto de investigación aprobado y titulado: **“FRECUENCIA DEL CROMOSOMA FILADELPHIA EN PACIENTES DE SOLCA (SOCIEDAD DE LUCHA CONTRA EL CÁNCER) – CUENCA CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA EN EL PERIODO 2014-2018”**; dirigido por el Dr. Gabriele Bigoni, previo a la obtención del título de Licenciadas en Laboratorio Clínico. Además, mediante el presente documento nos comprometemos que toda la información recolectada de los pacientes se utilizará explícitamente en el estudio investigativo y bajo confidencialidad por lo que, no se revelará bajo ningún concepto información que permita identificar a los pacientes o causar daño a los mismos.

La investigación proporcionará datos importantes sobre la casuística de nuestra población. Por la favorable acogida expresamos nuestro agradecimiento.

Atentamente



Paula Dennise Molina Beltrán



María del Carmen Nugra Sánchez